

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520091153019

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

油酰乙醇胺对动脉粥样硬化
发展进程的作用研究

Effects of oleoyethanolamide on the development of
atherosclerosis

范盎然

指导教师姓名: 傅 瑾 教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩时间: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

研究背景：动脉粥样硬化（AS）是现在世界范围内最普遍存在的严重威胁人类健康的心血管疾病之一。随着肥胖和糖尿病患病人口比例的不断上升，由动脉粥样硬化引起的心血管疾病如冠心病（CHD）等已经成为全球人口死亡的主要原因。冠状动脉的粥样硬化的情况也已经成为临床上考察心血管系统是否健康的重要检测项目。因此，寻找动脉粥样硬化药物的研究成为国内外药物研究的热点。

很多学者认为，动脉粥样硬化的发展进程从童年就已经开始了，它缓慢且不易察觉的发展，直到我们步入中年时才表现出症状。肥胖、高血压、高脂血症和糖尿病等代谢紊乱疾病是动脉粥样硬化诱发的主要因素。而动脉粥样硬化顽固斑块一旦形成，则很难将其清除根治。所以，对于动脉粥样硬化的预防就显得尤为重要。

PPAR- α 能调控能量代谢、抑制炎症反应、和保护内皮功能，与动脉粥样硬化发生发展密切相关，故而成为防治动脉粥样硬化的重要研究靶点，目前PPAR- α 的合成配体已成为临床治疗心血管疾病的一线药物。因此，OEA作为PPAR- α 的内源性配体，其抗动脉粥样硬化的作用亟待研究。

目的：探讨OEA对动脉粥样硬化发展进程中各个环节的作用、相关机制及其动物模型中的作用效果。**方法：**采用ox-LDL诱导HUVEC非正常增值及凋亡、VSMC迁移和巨噬细胞内炎症反应；采用大鼠动脉球囊拉伤致粥样硬化模型及ApoE敲除小鼠动脉粥样硬化模型；使用Annexin V/PI染色和流式细胞技术检测OEA对ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡的作用；使用CCK-8试剂盒检测OEA对ox-LDL诱导的内皮细胞非正常增值的作用；使用transwell小室检测OEA对ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞迁移的作用；使用荧光定量PCR技术和酶联免疫吸附实验技术检测OEA在体外和体内实验中对PPAR- α 、M-CSF、TNF- α 、IL-6、iNOS和COX-2等基因mRNA和蛋白表达的影响；使用石蜡切片、H-E染色法检测OEA对动物模型腹主动脉组织病变的作用；使用油红O染色法直观检测OEA对ApoE敲除小鼠动脉粥样硬化的作用；使用化学反应试剂盒检测OEA对动物模型血清中总胆固醇、甘油三酯、LDL、HDL、ox-LDL及TNF- α 的作用。**结果：**

摘要

本论文实验结果显示，OEA能够显著抑制由ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞的非正常增殖和凋亡；同时，OEA能够抑制ox-LDL诱导的大鼠血管平滑肌细胞迁移；在巨噬细胞中，ox-LDL能够诱导TNF- α 、CRP、M-CSF、IL-6、iNOS及COX-2的表达升高，PPAR- α 表达降低，OEA能够逆转这些变化，且OEA的这种作用可被PPAR- α 拮抗剂——MK886拮抗。在大鼠动脉球囊拉伤致粥样硬化和ApoE敲除小鼠动脉粥样硬化模型中，OEA可降低血脂，提高抗动脉粥样硬化因子的表达，降低炎症，从而起到良好的抗动脉粥样硬化作用。**结论：**OEA通过激活PPAR- α 途径保护内皮细胞、抑制平滑肌细胞迁移并抑制炎症，对动脉粥样硬化发展进程起到强大的抑制作用。

关键词：油酰乙醇胺，过氧化物酶体增殖物激活受体，动脉粥样硬化，人脐静脉内皮细胞，大鼠血管平滑肌细胞，炎症，大鼠动脉球囊拉伤致粥样硬化模型，ApoE敲除小鼠动脉粥样硬化模型。

Abstract

Background: Atherosclerosis(AS) is one of the most principal causes of cardiovascular diseases which seriously threatens the public health throughout the world. Cardiovascular diseases are expected to be the main cause of death globally for the recent years owing to the rising incidence of obesity and diabetes in the world. Coronary artery atherosclerosis has been a major focus for clinical investigation and considerable strides have been made in the development of programmes to prevent and treat the clinical manifestations of this disease. Therefore, more and more focus have been put on searching for new drugs of atherosclerosis.

It is widely reported that atherosclerosis begins in childhood. Atherosclerosis is a process that starts early in life and progresses silently and slowly for decades, usually only manifesting clinically in middle age. Since childhood risk factors persist into adulthood, the lifelong burden of a dyslipidaemic trait and concomitant conditions such as obesity, hypertension, hyperlipidemia and diabetes has a major impact on the silent phase of this disease. Once the atherosclerotic plaque has formed, there is barely effective clinical treatment to remove it. So it seems more and more important to find a way to prevent it.

PPAR- α has become an important research target of atherosclerosis due to its regulation of calorie metabolism, inflammation and endothelial function. The endogenous PPAR- α ligand oleoyethanolamide (OEA) has its potential for anti-atherosclerosis drugs, as the existing PPAR- α synthesis ligands have become first-line drugs for clinical treatment of cardiovascular disease.

Purpose: The purpose of our study is to investigate the effects of OEA on the evolution of atherosclerosis response and different animal models.

Methods: Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) apoptosis was detected by Annexin V/PI-FTIC staining and flow cytometer, and VSMC migration assays were performed with transwell chamber. The expression level of mRNA and protein were detected by quantitative real-time PCR and ELISA. Bouin's solution-fixed abdominal aorta tissues were embedded in paraffin and cut into 4 μ m thick sections for histomorphological examination. After drying, abdominal aorta tissue section slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The serum levels of total cholesterol (TC),

triglyceride (TG) were determined using an Auto Chemistry Analyzer.

Results: Data showed that, in HUVEC and VSMC cells, OEA reduces cell apoptosis and migration. In RAW 246.7 cells, OEA decreased the expression levels of inflammatory cytokines, and LPS-induced LDL oxidant reverses by OEA. Furthermore, OEA prevents the formation of atherosclerotic plaques in aorta lesion rats and ApoE(-/-) mice.

Conclusion: The data suggests that OEA played a certain role on preventing the the evolution atherosclerosis through activation of PPAR- α .

Keywords: oleoyethanolamide; Peroxisome Proliferator-activated Receptors; atherosclerosis ;Human umbilical vein endothelial cells;rat vascular smooth muscle cells; inflammation; atherosclerosis following balloon catheter injury of hyperlipidemia rats; ApoE knock out mice.

目 录

摘 要.....	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 动脉粥样硬化概述	1
1.1.1 动脉粥样硬化简介	1
1.1.2 动脉粥样硬化发病机制及发展进程	1
1.2 PPAR- α 概述	3
1.2.1 PPARs 简介	3
1.2.2 PPAR- α 的生物活性	4
1.2.3 PPAR- α 的配体	6
1.2.4 PPAR- α 与动脉粥样硬化	7
1.3 油酰乙醇胺 (OEA) 概述	10
1.3.1 OEA 的生物合成和水解	10
1.3.2 OEA 的生物活性	11
1.4 本论文的主要内容和研究意义	13
参 考 文 献	14
第二章 OEA 对内皮细胞凋亡及其机制的研究	26
2.1 OEA 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡的影响	26
2.1.1 仪器和试剂	26
2.1.2 实验方法	27
2.1.3 实验结果和讨论	27
2.2 OEA 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞非正常增殖的影响	29
2.2.1 仪器和试剂	29
2.2.2 实验方法	30
2.2.3 实验结果和讨论	30
2.3 本章小结	31
参 考 文 献	32

第三章 OEA 对大鼠血管平滑肌细胞迁移的作用	33
3.1 实验仪器和试剂	33
3.2 实验方法	34
3.3 实验结果和讨论	35
3.4 本章小结	36
参 考 文 献	37
第四章 OEA 对巨噬细胞炎症的作用	38
4.1 OEA 对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 内炎症反应的作用	38
4.1.1 实验仪器与试剂	38
4.1.2 实验方法	39
4.1.3 实验结果和讨论	41
4.2 OEA 对 LPS、LDL 诱导的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 内炎症反应的作用。	42
4.2.1 实验仪器与试剂	42
4.2.2 实验方法	42
4.2.3 实验结果和讨论	43
4.3 OEA 对 ox-LDL 诱导的小鼠原代巨噬细胞炎症反应的作用 ...	44
4.3.1 实验仪器与试剂	44
4.3.2 实验方法	45
4.3.3 实验结果和讨论	46
4.4 本章小结	48
第五章 OEA 对大鼠动脉球囊损伤致粥样硬化病变的作用	49
5.1 实验仪器和试剂	49
5.2 实验动物	49
5.3 实验方法	50
5.4 实验结果和讨论	55
5.5 本章小结	58
参 考 文 献	59
第六章 OEA 对 ApoE 敲除小鼠动脉粥样硬化的作用	60

6.1 实验仪器和试剂	60
6.2 实验动物	60
6.3 实验方法	60
6.4 实验结果和讨论	62
6.5 本章小结	67
参 考 文 献	68
第七章 结论	69
附录（缩略语表）	71
致 谢	72

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Atherosclerosis	1
1.1.1 Introduction of atherosclerosis	1
1.1.2 Evolution of atherosclerosis	1
1.2 Peroxisome proliferator activated reportor alpha	3
1.2.1 Introduction of PPARs	3
1.2.2 Bioactivities of PPAR- α	4
1.2.3 Ligands of PPAR- α	6
1.2.4 Role of PPAR- α in atherosclerosis	7
1.3 Overview of oleoyethanolamide (OEA)	10
1.3.1 Biosynthesis and hydrolysis of OEA	10
1.3.2 Bioactivities of OEA	11
1.4 Primary content and research of paper	13
Reference	14
Chapter 2 Effect of OEA on HUVECs reactivity	26
2.1 Effect of OEA on ox-LDL induced HUVECs apoptosis	26
2.1.1 Instruments and reagents	26
2.1.2 Experimental methods	27
2.1.3 Results and Discussions	27
2.2 Effect of OEA on ox-LDL induced HUVECs proliferation	29
2.2.1 Instruments and reagents	29
2.2.2 Experimental methods	30
2.2.3 Results and discussions	30
2.3 Conclusion	31
Reference	32
Chapter 3 Effect of OEA on VSMCs migration	33

3.1 Instruments and reagents	33
3.2 Experimental methods	34
3.3 Results and discussion	35
3.4 Conclusion	36
References	37
Chapter4 Effects of OEA on inflammation in macrophages	38
4.1 Effect of OEA on ox-LDL induced inflammation in RAW264.7	38
4.1.1 Instruments and reagents	38
4.1.2 Experimental methods	39
4.1.3 Results and Discussions	41
4.2 Effect of OEA on LPS/LDL induced inflammation in RAW264.7	42
4.2.1 Instruments and reagents	42
4.2.2 Experimental methods	42
4.2.3 Results and discussions	43
4.3 Effect of OEA on ox-LDL induced inflammation in primary macrophages of mice	44
4.3.1 Instruments and reagents	44
4.3.2 Experimental methods	45
4.3.3 Results and discussions	46
4.4 discussion	48
Chapter 5 Effect of OEA on SD rats	49
5.1 Instruments and reagents	49
5.2 Experimental animals	49
5.3 Experimental methods	50
5.4 Results and discussion	55
5.5 Conclusion	58
References	59
Chapter 6 Effect of OEA on ApoE (-/-) mice	60
6.1 Instruments and reagents	60
6.2 Experimental animals	60

6.3 Experimental methods	60
6.4 Results and discussion	62
6.5 Conclusion	67
References	68
Chapter 7 Conclusion	69
Appendix	71
Acknowledgement	72

第一章 前言

1.1 动脉粥样硬化概述

1.1.1 动脉粥样硬化简介

动脉粥样硬化（AS）是现在世界范围内最普遍存在的发病率和致死率均高的疾病之一，其表现是动脉壁内脂质的慢性堆积，血管壁内膜的纤维化及坏死、崩解，平滑肌细胞迁移，形成动脉脂质包裹的顽固板块，导致动脉壁硬化最终形成，并由此引发动脉管腔狭窄等问题^[1]。随着肥胖人口比例的不断上升，近15年来，由动脉粥样硬化引起的心血管疾病如冠心病（CHD）等已经成为全球人口死亡的主要原因。冠状动脉的粥样硬化情况也已经成为临床上考察心血管系统是否健康的重要检测项目。然而，动脉粥样硬化并不是一个简单的疾病，它会在循环系统的多种器官引发严重的后遗症，如脑、肾脏、肠系膜和四肢各处的血液循环系统。

目前更多的学者认为，动脉粥样硬化的诱因在童年就已经开始存在了，它开始在生命的幼年期，并在接下来的几十年中缓慢且不易察觉的发展，直到生命步入中年时才显露出部分症状。肥胖、高血压、高脂血症和糖尿病等代谢紊乱疾病是这个阶段动脉粥样硬化诱发的主要因素，近期的研究还认为促凝血和促炎性因素也是动脉粥样硬化的危险因素^[2]。所以，对于动脉粥样硬化的预防就显得尤为重要，我们可以通过对其发展过程各个步骤进行预防提高人类的生活质量和平均寿命，减少发病率和死亡率。

1.1.2 动脉粥样硬化发病机制及发展进程

目前，人们对动脉粥样硬化的发病机制尚未完全清楚，科学家们一直在尝试从不同方面研究动脉粥样硬化发生发展的过程，并由此产生了多种学说和假设，包括损伤学说、脂肪浸润学说、血小板聚集学说和克隆学说等等。

我们通常认为，AS与血浆中低密度脂蛋白（LDL）的水平密切相关^[3]。流行病学研究指出了很多增加AS发病率的基因和环境层面的因素^[4]，遗传因素包括血脂异常、高血压、糖尿病、肥胖和慢性炎症；环境因素则包括高脂饮食、吸烟和缺乏合理运动等^[4,5]。虽然冠心病的相关基因都是极其复杂的，但是其可遗传

性仍然可能达到40-60%^[6]。由于高血脂与动脉粥样硬化之间的密切关系，目前用于治疗AS的药物大多为降血脂的他丁类药物^[7]，然而，这类药物对AS的实际作用却并不理想，尤其是临床上发现，血脂水平相当的病人并不会患有相似程度的动脉粥样硬化^[3,8,9]，这提示AS的发病机制并不是单纯由高血脂引发。于是，科学家尝试用不同的动物模型来对这一问题进行研究，如兔、猪、非人灵长类和啮齿类动物。而因为载脂蛋白E（ApoE）或低密度脂蛋白受体（LDL-R）在机体脂类平衡中的重要作用，研究中最常用的动物模型是敲除ApoE或LDL-R基因的小鼠^[10]，这类小鼠被高脂喂养时极易形成高脂血症，更加贴近人类动脉粥样硬化的患病过程，但是目前的模型中，尚未有成功因动脉粥样硬化引发心肌梗死的成功案例。然而，因为这些模型中，都是由于过表达或缺失某些脂类转运代谢关键基因而引起动脉粥样硬化，这更加提示着我们，动脉粥样硬化的形成与脂类代谢障碍引起的慢性炎症相关^[11]。

随着研究的不断深入，近年来AS不再被认为是由单一病因引起的，而是一个动态的复杂过程，它的发生涉及到血管内皮细胞、巨噬细胞、血液脂质成分、血液流动、炎症发生等一系列复杂的过程。1999年，Ross教授在他之前提出的损伤学说上作出了改进，提出动脉壁的损伤导致了后期炎症和斑块的形成，明确指出了AS是一种炎性反应，是内皮细胞和平滑肌细胞在损伤后的一种炎性增生反应^[12]。这一学说得到普遍认可。

AS的形成过程如图1.1，可简单的概括为：早期危险因子造成血管内皮损伤以后，产生炎性因子和粘附分子的释放，使血液中的单核细胞和T细胞进入内皮下间隙，同时脂质（主要以低密度脂蛋白）浸润，进入内皮层，并被内皮细胞氧化为氧化型低密度脂蛋白；单核细胞在炎性的刺激下转化为巨噬细胞，巨噬细胞表面的清道夫受体介导 ox-LDL 的吸收，使大量脂质进入巨噬细胞，形成巨噬细胞源性泡沫细胞，大量泡沫细胞形成坏死中心；平滑肌细胞在刺激下增生和迁移，包裹坏死中心形成纤维帽；炎性刺激整个过程不断循环，最终导致泡沫细胞坏死崩解，产生粥样斑块坏死物，动脉粥样硬化即形成。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库